



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/543	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/47000 (43) Date de publication internationale: 22 octobre 1998 (22.10.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00772</p> <p>(22) Date de dépôt international: 16 avril 1998 (16.04.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/04923 16 avril 1997 (16.04.97) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ELAISSARI, Abdelhamid [FR/FR]; 7, rue Jacques Monod, F-69007 Lyon (FR). DURACHER, David [FR/FR]; 104, rue du Valmartin, F-78860 Saint Nom la Breteche (FR). PICHOT, Christian [FR/FR]; 5, allée Roland Garros, F-69960 Corbas (FR). MALLET, François [FR/FR]; 84, rue Anatole France, F-69100 Villeurbanne (FR). NOVELLI-ROUSSEAU, Armelle [FR/FR]; 29, rue du Parc, F-38180 Seyssins (FR).</p> <p>(74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR ISOLATING A TARGET BIOLOGICAL MATERIAL, CAPTURE PHASE, DETECTION PHASE AND REAGENT</p>		
<p>(54) Titre: PROCEDE DE MISE EN EVIDENCE D'UN MATERIEL BIOLOGIQUE CIBLE, PHASE DE CAPTURE, PHASE DE DETECTION ET REACTIF</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a method for isolating a target biological material contained in a sample, consisting in the following steps: providing a capture phase, in microparticulate or linear form, consisting of at least a first particulate or linear polymer, with apparent hydrophile character and first complexing groups, the latter being bound by co-ordination to a first transition metal, which is itself bound to a first biological entity capable of specifically recognising the target biological material; contacting said target biological material with at least the capture phase; and detecting the capture phase-target biological material complex, optionally with a detection phase, in microparticulate or linear form, and consisting of at least a second particulate or linear polymer, with apparent hydrophile character and second complexing groups, the latter being bound by co-ordination to a second transition metal, which is itself bound to a second biological entity capable of specifically recognising the target biological material, and a marker.</p>		
<p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne un procédé de mise en évidence d'un matériel biologique cible contenu dans un échantillon, selon lequel on dispose d'une phase de capture, sous forme microparticulaire ou linéaire, et constituée par au moins un premier polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des premiers groupements complexants, ces derniers étant liés par coordination à un premier métal de transition, qui est lui-même lié à une première entité biologique susceptible de reconnaître spécifiquement le matériel biologique cible; on met en contact ledit matériel biologique cible avec au moins la phase de capture; et on détecte le complexe phase de capture - matériel biologique cible, éventuellement avec une phase de détection, une phase de détection sous forme microparticulaire ou linéaire, et constituée par au moins un second polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des seconds groupements complexants, ces derniers étant liés par coordination à un second métal de transition, qui est lui-même lié à une seconde entité biologique susceptible de reconnaître spécifiquement le matériel biologique cible, et un marqueur.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Procédé de mise en évidence d'un matériel biologique cible, phase de capture, phase de détection et réactif.

La présente invention relève du domaine de la mise en évidence ou détection d'un matériel biologique, dit matériel biologique cible, contenu dans un échantillon, par un procédé utilisant une phase de capture, et éventuellement une phase de détection, selon lequel on expose ledit matériel à la phase de capture au moins, puis on détecte le complexe phase de capture - matériel biologique cible formé, éventuellement avec ladite phase de détection.

Dans la présentation de l'invention qui suit, il est en particulier fait référence à la mise en évidence d'un matériel biologique cible protéique, mais bien entendu, la portée de l'invention ne saurait s'y limiter.

Ainsi, par matériel biologique, on entend selon l'invention, notamment, un matériel protéique ou glycoprotéique tel qu'un antigène, un haptène, un anticorps, une protéine, un peptide, une enzyme, un substrat, et fragments de ceux-ci ; mais aussi un matériel nucléique tel qu'un acide nucléique (ADN ou ARN), un fragment d'acide nucléique, une sonde, une amorce ; une hormone.

Conformément à l'article de M. Kempe et al. (1), on connaît un procédé de capture d'une protéine cible présentant des séquences polyhistidines, à savoir la RNase A, selon lequel on utilise la forte affinité du groupement imidazole de l'histidine pour les métaux.

Ce procédé comprend les étapes suivantes :

- on dispose d'une phase de capture consistant en des particules de silice, fonctionnalisées par des groupes méthacrylates,

- on met en contact la protéine cible et un agent complexant des métaux, à savoir, l'acide N-(4-vinyl)-benzyl-iminodiacétique (VBIDA), avec un métal, pour

obtenir un complexe résultant de liaisons de coordination entre le métal et les groupes imidazole de l'histidine, et de liaisons de coordination entre le métal et les groupes carboxyliques de VBIDA, et

5 - on met en contact lesdites particules de silice fonctionnalisées avec le complexe formé ci-dessus.

Ce procédé d'immobilisation ne conduit pas à une fixation optimale de la protéine cible.

10 Le document US-A-4 246 350 décrit un procédé d'immobilisation d'une enzyme utilisant une phase de capture qui consiste en un polymère macroporeux ayant des groupements complexants liés à un métal de transition. L'inconvénient d'une telle phase de capture résulte directement de la nature macroporeuse du polymère. En
15 effet si celle-ci permet de maximaliser l'adsorption de l'enzyme sur la phase de capture, elle devient désavantageuse au moment de la mise en évidence de l'enzyme à l'aide d'une phase de détection, car la proportion d'enzyme adsorbée dans les pores du polymère ne
20 sera pas accessible à ladite phase de détection.

Selon la présente invention, on apporte un procédé de mise en évidence d'un matériel biologique cible, utilisant une phase de capture telle qu'elle permet d'optimiser la fixation de ce matériel sur celle-ci, tout
25 en diminuant, voire éliminant, toute réaction secondaire d'adsorption dudit matériel sur ladite phase de capture. L'interaction entre la phase de capture est spécifique permettant ainsi, lors de la mise en évidence, de détecter la proportion de matériel biologique effectivement fixé
30 sur la phase de capture.

A cette fin, le procédé de mise en évidence d'un matériel biologique cible, utilise une phase de capture présentant les caractéristiques suivantes :

35 elle est sous forme microparticulaire ou sous forme linéaire,

elle est constituée par au moins un premier polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile, et des premiers groupes complexants, fixés de manière covalente,

5 les premiers groupes complexants sont liés par coordination à un premier métal de transition,

le premier métal de transition est lui-même lié par chélation à une première entité biologique qui est susceptible de reconnaître spécifiquement le matériel
10 biologique cible.

Selon une variante du procédé de l'invention, la phase de capture définie ci-dessus comprend un marqueur, pour obtenir une phase de détection.

Selon une autre variante du procédé, on dispose
15 en outre d'une phase de détection qui présente les caractéristiques suivantes :

elle est sous forme microparticulaire ou linéaire,

20 elle est constituée par au moins un second polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des seconds groupements complexants,

les seconds groupements complexants sont liés par coordination à un second métal de transition,

25 le second métal de transition est lui-même lié par chélation à une seconde entité biologique susceptible de reconnaître spécifiquement le matériel biologique cible, et un marqueur,

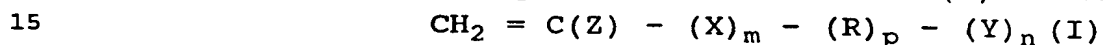
elle comprend un marqueur.

30 Le terme "microparticulaire" signifie selon l'invention sous forme de particules d'une taille au plus égale à 10 μm . De préférence elles ont une taille ne dépassant pas 5 μm .

35 Le premier et/ou second polymère particulaire ou linéaire est avantageusement un polymère hydrophile, et notamment un polymère fonctionnalisé obtenu par

polymérisation d'un monomère hydrosoluble, d'acrylamide, d'un dérivé d'acrylamide, de méthacrylamide ou d'un dérivé de méthacrylamide, d'au moins un agent de réticulation et d'au moins un monomère fonctionnel.

5 Pour l'obtention de ce polymère avantageux, le monomère hydrosoluble est de préférence choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-n-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le
10 N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM). Le ou les monomères fonctionnels appartiennent de préférence au groupe de ceux qui répondent à la formule (I) suivante :



dans laquelle :

Z représente H, un radical alkyle en C1-C5, le radical benzyle, -COOH, ou -CO-NH-CH(CH₃)₂,

Y représente -CH₂-COOH, -N(CH₂-COOH)₂,
20 -N(CH-COOH)(CH₂-COOH), ou -N(CH₂-CH₂-NH₂)₂,
(CH₂-COOH)

X représente -NH(CH₂-CH₂-), -N(CH₂-CH₂-)₂,
-N(CH₂-COOH)(CH₂-CH₂-), ou CH(COOH)-,

R représente une chaîne hydrocarbonée linéaire,
25 éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome, tel que O ou N,

m et p sont chacun un entier qui, indépendamment l'un de l'autre, équivalent à 0 ou 1, et

n est un entier variant entre 1 et 3.

30 A titre d'exemple le monomère fonctionnel est choisi parmi les acides carboxyliques, éventuellement azotés, l'acide itaconique, les dérivés acryliques et les dérivés méthacryliques.

Comme dit précédemment, la phase de capture de
35 l'invention peut se présenter sous forme microparticulaire ou sous forme linéaire.

Quand elle est particulaire, elle peut ne consister qu'en ledit polymère particulaire, ou bien elle peut posséder un support particulaire tel qu'un noyau organique ou inorganique, hydrophile ou hydrophobe, revêtu dudit premier polymère sous forme particulaire et/ou linéaire.

Ledit noyau est avantageusement choisi dans le groupe comprenant le polystyrène, la silice et les oxydes métalliques. Il peut en outre comprendre un composé magnétique.

La phase de capture peut aussi comprendre un support plan, recouvert en totalité ou en partie par le premier polymère sous forme particulaire et/ou linéaire.

Comme les exemples de la présente description l'illustreront, le premier et/second polymère particulaire préféré de l'invention est le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) comprenant des groupes complexants dérivés de l'acide itaconique ou de l'anhydride maléique-co-méthylvinyléther.

Le premier et/ou second métal de transition est avantageusement choisi parmi le zinc, le nickel, le cuivre, le cobalt, le fer, le magnésium, le manganèse, le plomb, le palladium, le platine et l'or.

Selon une mise en oeuvre préférentielle du procédé de l'invention, la mise en contact de la première entité biologique avec la phase de capture et/ou la mise en contact de la seconde entité biologique avec la phase de détection, est effectuée à un pH supérieur ou égal au point isoélectrique de ladite première et seconde entités biologiques, respectivement.

Par entité biologique, on entend un matériel biologique tel que défini précédemment, à l'état isolé, et présentant avec le matériel biologique cible une affinité, pour former avec ledit matériel un complexe du type antigène-anticorps, enzyme-substrat, hormone-récepteur, ADN-ADN, ADN-ARN, ...

Avantageusement la première entité biologique est une protéine. A titre d'exemple c'est la protéine p24 ou gp160 du VIH, en vue de la mise en évidence dans le sérum d'un patient d'anticorps dirigés contre l'une ou l'autre
5 de ces protéines.

La première et/ou la seconde entité biologique comprend une partie susceptible de réagir avec un métal de transition, cette partie consiste de préférence en une région riche en histidine et/ou en cystéine.

10 Les sites d'affinité de l'entité biologique pour les ions métalliques de transition, consistent avantageusement en des sites riches en acides aminés choisis parmi l'histidine, la cystéine, la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine.

15 Les sites peuvent se présenter sous la forme de suites desdits acides aminés identiques ou différents, contigus ou non, mais voisins.

Ces sites peuvent exister naturellement dans l'entité biologique, quand elle est protéique notamment.
20 Ou bien ils peuvent être "rapportés" préalablement dans l'entité biologique, sous forme de "tag" dont une définition est donnée ci-après, selon des techniques bien connues de l'homme du métier telles que celle employée pour la purification des protéines par le procédé IMAC
25 (Immobilized Metal ion-Affinity Chromatography) sur des résines (2,3). A titre d'exemple, de tels sites peuvent être incorporés dans une entité biologique protéique et notamment une protéine, par génie génétique pour obtenir des protéines recombinantes.

30 Un "tag" peut être défini comme une séquence d'acides aminés rapportée, c'est-à-dire ajoutée à l'entité biologique originale, qui est introduite en un lieu privilégié de la séquence originale où elle est exposée de façon pertinente vis-à-vis de sa chélation avec le métal
35 de transition. Cette séquence contient des acides aminés choisis parmi ceux précités et qui sont distribués à

l'intérieur de la séquence, soit de façon contigüe (notamment deux acides aminés précités contigus, préférentiellement six acides aminés précités contigus), soit avec une densité suffisante (notamment 25 %, 5 préférentiellement supérieure ou égale à 33 %). On préférera un "tag" qui consiste en une suite de 6 résidus histidine et/ou cystéine contigus.

Selon le procédé de l'invention, on peut mettre en évidence un matériel biologique cible par une réaction 10 d'agglutination en utilisant une phase de capture décrite précédemment.

Le marqueur de la phase de détection est avantageusement choisi dans le groupe consistant en une enzyme, la biotine, l'iminobiotine, un composant 15 fluorescent, un composant radioactif, un composant chimioluminescent, un composant d'électrodensité, un composant magnétique, un antigène, un haptène et un anticorps.

Selon le procédé de l'invention, on peut mettre 20 en évidence un matériel biologique cible par la technique ELISA en utilisant une phase de capture et une phase de détection décrites précédemment.

L'invention concerne aussi :

- une phase de capture d'un matériel biologique 25 cible, sous forme microparticulaire ou linéaire et constituée par au moins un premier polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des premiers groupements complexants, ces derniers étant liés par coordination à un premier métal de transition, qui est 30 lui-même lié à une première entité biologique susceptible de reconnaître le matériel biologique cible,

- une phase de détection d'un matériel biologique cible, sous forme microparticulaire ou linéaire et constituée par au moins un second polymère particulaire ou 35 linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des seconds groupements complexants, ces derniers étant liés

par coordination à un second métal de transition, qui est lui-même lié à une seconde entité biologique susceptible de reconnaître le matériel biologique cible, et un marqueur,

5 - un réactif de mise en évidence d'un matériel biologique cible, comprenant une phase de capture et éventuellement une phase de détection telles que définies précédemment,

 chacune de la phase de capture et de la phase de
10 détection présentant les caractéristiques déterminées précédemment.

Les caractéristiques et avantages de la présente invention sont ci-après illustrés par les Exemples 1 à 5 et les Figures 1 à 3 selon lesquelles:

15 Figure 1 représente un isotherme de couplage du polymère AMVE sur des particules de polymère particulaire poly-(St-NIPAM-AEM).

 Figure 2 représente la variation de la quantité de protéine RH24 adsorbée sur un polymère particulaire
20 poly-(St-NIPAM-AMVE) en fonction du pH et de la salinité du milieu.

 Figure 3 représente la quantité de protéine RH24 complexée sur un polymère particulaire poly-(St-NIPAM-AMVE) en fonction du pH et de la salinité du milieu et
25 pour une concentration en ions Zn^{2+} de l'ordre de 0,3 M.

EXEMPLE 1: Réactifs employés en vue de la préparation de la phase de capture de l'invention

Monomère :

30 - Styrène à 99 % (Janssen Chemica, ref13 279-87),
Mw=104,5 g.mol⁻¹

Il est utilisé après purification par distillation sous vide.

 - N-isopropylacrylamide (NIPAM) (Kodak ref 10
35 982), Mw=113,16 g.mol⁻¹

Il est recristallisé avant son utilisation, comme suit. Il est dissous dans un mélange hexane/toluène (60/40, v/v).

Monomère fonctionnel :

- 5 - Chlorure de 2-aminoéthyl méthacrylate (AEM)
(Kodak ref 18513), $M_w = 165,62 \text{ g.mol}^{-1}$

Il est utilisé sans recristallisation.

Agent de réticulation :

- 10 - N,N-méthylène bisacrylamide (MBA) (Amilabo ref
10897), $M_w = 271,19 \text{ g.mol}^{-1}$

Il est utilisé sans recristallisation.

Amorceur :

- Hydrochlorure de 2,2'azobis (2-amidino propane)
(V50) (Wako trade name), $M_w = 271,19 \text{ g.mol}^{-1}$

- 15 Le V50 est recristallisé avant son utilisation,
comme suit. L'amorceur est dissous dans un mélange 60/40
d'eau et d'acétone. La solution est filtrée sous vide avec
un rendement de 30%.

- 20 - Persulfate de potassium (Prolabo), $M_w = 270,32$
 g.mol^{-1}

Il est utilisé sans recristallisation.

Groupes complexants :

- Acide itaconique (Aldrich), $M_w = 132 \text{ g.mol}^{-1}$

Il est utilisé sans recristallisation.

- 25 - Anhydride maléique-co-méthylvinyléther (AMVE)
(Polysciences)

Il est utilisé sans recristallisation.

30 **EXEMPLE 2: Synthèse du polymère fonctionnalisé
poly(N-isopropylacrylamide)-acide itaconique**

- 2 Dans un réacteur thermostaté de 250 ml, sont
versés 4,38 g de N-isopropylacrylamide, 200 g d'eau,
0,37 g de MBA, 0,5 g d'acide itaconique et 0,45 g
d'acrylamide. Le mélange est maintenu sous agitation à 300
35 tours par minute sous atmosphère d'azote et à une
température de 70°C. Le persulfate de potassium (0,05 g),

amorceur hydrosoluble, est introduit (en solution dans 5 g d'eau) dans la solution au dernier moment pour démarrer la réaction de polymérisation.

La polymérisation est poursuivie pendant 5 heures dans les mêmes conditions.

Le taux de conversion de la polymérisation est évalué à 98%.

Le polymère fonctionnalisé obtenu présente les caractéristiques suivantes :

- le diamètre des particules, mesuré par diffusion dynamique de la lumière, est de 1500 nm,
- le dosage des fonctions superficielles, suivi par conductimétrie, a donné 0,3 mmole/g de latex de groupements acide faible (-COOH).

EXEMPLE 3: Modification des particules hydrophiles aminées par greffage du polymère linéaire complexant poly-AMVE

1) Synthèse du polymère particulaire poly-(styrène-NIPAM)

a) Préparation du polymère particulaire hydrophile

Selon cet exemple la préparation consiste :

dans un premier temps, à synthétiser un polymère poly-(St-NIPAM) contenant les monomères de base, à savoir le styrène et le NIPAM, selon une polymérisation en réacteur fermé, avec 200 g d'eau, 18 g de styrène, 2 g de NIPAM et 0,2 g de V50, puis

dans un deuxième temps, à ajouter, à un degré de conversion donné, le monomère fonctionnel (AEM), seul ou en présence des réactifs de base, à savoir 5 g de NIPAM, 0 à 4 % de AEM (par rapport au NIPAM), 0,122 g de V50 et 0,069 g de BA.

Cette technique permet d'optimiser l'incorporation en surface d'un monomère fonctionnel. Les conditions de synthèse sont les mêmes que celles de la

polymérisation en réacteur fermé, c'est-à-dire température et agitation constante.

b) Caractéristiques du polymère particulaire
5 obtenu

Les résultats sur la structure du polymère obtenu, sa taille et sa polydispersité, sont regroupés dans le tableau 1 suivant.

10

Tableau 1

Désigna- tion du polymère	AEM %	(nm) 20°C (a)	(nm) 50°C (a)	chevelure (nm) (b)	(nm) MET (c)	Ip (c)
DD10	0	603	364	119	288	1,012
DD15	1	421	327	47	333	1,008
DD12	2	484	334	75	302	1,004
DD11	3	358	315	21	303	1,005

(a) : Diamètre déterminé par diffusion dynamique de la lumière à 20°C et à 50°C

15

(b) : La chevelure correspond à l'épaisseur de PNIPAM à la surface des particules

(c) : Diamètre et indice de polydispersité obtenu par microscopie électronique.

20

Les taux de fonctionnalisation des polymères obtenus exprimés par les résultats du dosage des fonctions amines présentes à la surface des polymères, sont mentionnés dans le tableau 2 suivant.

Tableau 2

Désignation du polymère	AEM (%) introduit	SPDP* mmol.m ⁻²
DD10	0	0,75
DD15	1	1,44
DD12	3	2,99
DD11	4	2,76

* : densité de charge calculée en utilisant la
5 taille à 20°C déterminée par diffusion dynamique de la
lumière.

2) Greffage du poly-AMVE sur les particules aminées

10 On fixe de façon covalente sur les polymères
obtenus selon 1) des groupes complexants, consistant,
selon le présent exemple, en des groupes dérivés de l'AMVE
(anhydride maléique-co-méthylvinyléther), qui est un
polymère linéaire.

15 L'utilisation de l'AMVE présente deux avantages :
d'une part, il permet, grâce à ses fonctions anhydrides
très réactives, un couplage facile avec les amines
présentes à la surface du polymère particulaire, et,
d'autre part, une fois le couplage réalisé, il expose de
20 nombreuses fonctions dicarboxyliques complexantes, qui
interagiront avec un métal de transition (Zn, Ni, Cu,
Co,...).

L'AMVE est utilisé en solution dans le DMSO
anhydre afin d'éviter l'hydrolyse des fonctions anhydrides
25 par lesquelles la réaction de couplage sur les fonctions
amines des polymères particulaires est possible. La
réaction de couplage doit être conduite dans un milieu
basique afin d'éviter la protonation des fonctions amines
des polymères. Le tampon utilisé est un tampon borate de

pH 8,2 et de force ionique 10^{-2} M. Le milieu de couplage ne doit pas excéder 10 % en volume de DMSO.

Les résultats qui apparaissent à la Figure 1 montrent une bonne corrélation entre les deux méthodes d'analyse. La pente initiale de l'isotherme de couplage montre que la réaction est totale pour des faibles quantités d'AMVE introduites. La valeur du plateau est de $2,75 \text{ mg.m}^{-2}$ et est atteinte très rapidement pour des faibles concentration en AMVE.

EXEMPLE 4 : Complexation d'un métal de transition avec le polymère ayant des groupes complexants

L'introduction d'un métal de transition dans une solution du polymère ayant des groupes complexants obtenu selon l'Exemple 2 ou 3 doit permettre la fixation du métal par complexation sur les particules. Cette complexation s'effectue par le biais des atomes d'oxygène des fonctions anhydrides. La présence de doublets libres sur les atomes d'oxygène permet de former des liaisons de coordination avec le métal de transition.

Le métal utilisé (Zn^{2+}) est introduit dans une solution du polymère afin d'obtenir une concentration en ion métallique en solution de 10^{-4} M. L'excès de cation métallique qui se trouve en solution est éliminé par des centrifugations successives.

EXEMPLE 5 : Complexation de la protéine RH24 utilisée comme entité biologique pour obtenir une phase de capture de l'invention

L'entité biologique retenue dans le cadre de cet exemple est la protéine recombinante modifiée (appelée RH24) en N-terminal par un "Tag" histidine (séquence de six résidus histidine contigus) (5). Cette protéine a une masse de $27.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ et un point isoélectrique de 6,1. Cette modification a été mise à profit pour réaliser la

complexation de la protéine sur un support particulière, pour obtenir une phase de capture de l'invention.

Afin de pouvoir déterminer la concentration de protéine complexée sur le latex, des études d'adsorption de la protéine ont été menées en parallèle.

Comme l'état de la technique le montre, ce sont les interactions électrostatiques qui gouvernent l'adsorption des protéines sur un polymère hydrophile (6). On a donc étudié l'effet de la force ionique et du pH sur la quantité de protéines adsorbées, afin de déterminer les conditions pour lesquelles l'adsorption est négligeable, voire nulle.

La figure 2 montre l'adsorption de la protéine RH24 sur le poly-(St-NIPAM-AMVE) obtenu selon l'Exemple 3.

Selon la figure 2, on observe que le taux d'adsorption de la RH24 est fortement dépendant du pH.

Une étude similaire a été effectuée pour la complexation en faisant varier les mêmes paramètres. La figure 3 montre les résultats de la complexation en fonction du pH, pour différentes forces ioniques et pour des concentrations constantes en ion complexant (Zn^{2+}).

Comme il est observé sur cette figure, la complexation de la protéine sur le poly-(St-NIPAM-AMVE) en présence de zinc est peu dépendante du pH excepté pour les faibles forces ioniques.

Ces résultats permettent de déterminer des conditions optimales de complexation au détriment de l'adsorption. Ainsi un pH supérieur ou égal à 7 permet d'avoir une adsorption quasi nulle tout en ayant une complexation proche de $1,5 \text{ mg.m}^{-2}$. Quant à la force ionique il faut qu'elle soit minimale pour favoriser la complexation.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Kempe M., Glad M. & Mosbach K., *Journal of molecular recognition*, **8**, 35 (1995)
- 5 (2) Porath J., Carlsson., Olsson., Belfrage J., *Nature*, **258**, 598 (1975)
- (3) Porath J., *Trends Anal. Chem.*, **7**, 254 (1988)
- (4) Hiroshi Inomata et al., *Macromolecules*, **27**, 6459-6464 (1994)
- 10 (5) Cheynet V., Verrier B., Mallet F., *proteine expression and purification*, **4**, 367 (1993)
- (6) Suzawa T., Shirahama H., *Advanced in Colloid and Interface Science*, **35**, 139 (1991).

REVENDICATIONS

1. Procédé de mise en évidence d'un matériel biologique cible contenu dans un échantillon, selon lequel
5 on dispose d'une phase de capture, on met en contact ledit matériel biologique cible avec au moins la phase de capture, et on détecte le complexe phase de capture - matériel biologique cible,

ledit procédé étant caractérisé en ce que,

10 la phase de capture est sous forme microparticulaire ou linéaire et est constituée par au moins un premier polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des premiers groupements complexants, ces derniers étant liés par
15 coordination à un premier métal de transition, qui est lui-même lié à une première entité biologique susceptible de reconnaître spécifiquement le matériel biologique cible.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé
20 en ce que la phase de capture comprend un marqueur pour obtenir une phase de détection.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on dispose en outre d'une phase de détection qui est sous forme microparticulaire ou linéaire et est
25 constituée par au moins un second polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des seconds groupements complexants, ces derniers étant liés par coordination à un second métal de transition, qui est lui-même lié à une seconde entité biologique susceptible
30 de reconnaître spécifiquement le matériel biologique cible, et un marqueur.

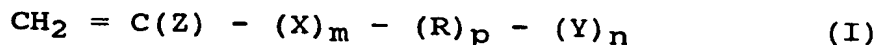
4. Procédé selon la revendication 1 ou 3, caractérisé en ce que le premier et/ou le second polymère est choisi dans le groupe des polymères hydrophiles.

35 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le premier et/ou le second polymère est un

polymère fonctionnalisé obtenu par polymérisation d'un monomère hydrosoluble, d'acrylamide, d'un dérivé d'acrylamide, de méthacrylamide ou d'un dérivé de méthacrylamide, d'au moins un agent de réticulation et
5 d'au moins un monomère fonctionnel.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le monomère hydrosoluble est choisi parmi le N-isopropylacrylamide, le N-éthylméthacrylamide, le N-n-propylacrylamide, le N-n-propylméthacrylamide, le N-n-isopropylméthacrylamide, le N-cyclopropylacrylamide, le
10 N,N-diéthylacrylamide, le N-méthyl-N-isopropylacrylamide, le N-méthyl-N-n-propylacrylamide, le premier monomère étant de préférence le N-isopropylacrylamide (NIPAM).

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le monomère fonctionnel répond à la formule (I)
15 suivante :



dans laquelle :

Z représente H, un radical alkyle en C1-C5, le
20 radical benzyle, -COOH, ou -CO-NH-CH(CH₃)₂,

Y représente -CH₂-COOH, -N(CH₂-COOH)₂,
-N(CH₂-COOH)(CH₂-COOH), ou -N(CH₂-CH₂-NH₂)₂,
(CH₂-COOH)

X représente -NH(CH₂-CH₂-), -N(CH₂-CH₂-)₂,
25 -N(CH₂-COOH)(CH₂-CH₂-), ou CH(COOH)-,

R représente une chaîne hydrocarbonée linéaire, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome, tel que O ou N,

m et p sont chacun un entier qui, indépendamment
30 l'un de l'autre, équivalent à 0 ou 1, et

n est un entier variant entre 1 et 3.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le monomère fonctionnel est choisi parmi les dérivés carboxyliques éventuellement azotés, l'acide
35 itaconique, les dérivés acryliques et les dérivés méthacryliques.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la phase de capture et/ou la phase de détection est sous forme microparticulaire et en ce que la taille moyenne des particules est au plus égale à 5 μm .

10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la phase de capture comprend en outre un support plan ou particulaire.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le support est particulaire et consiste en un noyau organique ou inorganique, hydrophile ou hydrophobe.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit noyau est choisi dans le groupe comprenant le polystyrène, la silice et les oxydes métalliques.

13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que ledit noyau renferme en outre un composé magnétique.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que ledit noyau est revêtu dudit premier polymère, ce dernier étant linéaire.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que ledit noyau est revêtu dudit polymère, ledit polymère étant particulaire.

16. Procédé selon la revendication 1 ou 3, caractérisé en ce que le premier et/ou le second polymère est le poly(N-isopropylacrylamide) et les groupes complexants sont dérivés de l'acide itaconique ou de l'anhydride maléique-co-méthylvinyléther.

17. Procédé selon la revendication 1 ou 3, caractérisé en ce que le premier et/ou second métal de transition est choisi parmi le zinc, le nickel, le cuivre,

le cobalt, le fer, le magnésium, le manganèse, le plomb, le palladium, le platine et l'or.

18. Procédé selon la revendication 1 ou 3, caractérisé en ce que la mise en contact de la première entité biologique avec la phase de capture et/ou la mise en contact de la seconde entité biologique avec la phase de détection, est effectuée à un pH supérieur ou égal au point isoélectrique de ladite première et seconde entités biologiques, respectivement.

19. Procédé selon la revendication 1 ou 3, caractérisé en ce que la première et/ou la seconde entité biologique est riche en histidine et/ou en cystéine.

20. Procédé selon la revendication 1 et l'une quelconque des revendications 4 à 19, caractérisé en ce qu'il met en jeu une réaction d'agglutination.

21. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que le marqueur de la phase de détection est choisi dans le groupe consistant en une enzyme, la biotine, l'iminobiotine, un composant fluorescent, un composant radioactif, un composant chimioluminescent, un composant d'électrodensité, un composant magnétique, un antigène, un haptène et un anticorps.

22. Procédé selon la revendication 2 ou 3 et l'une quelconque des revendications 4 à 19 ou 21, caractérisé en ce qu'il met en jeu la technique ELISA.

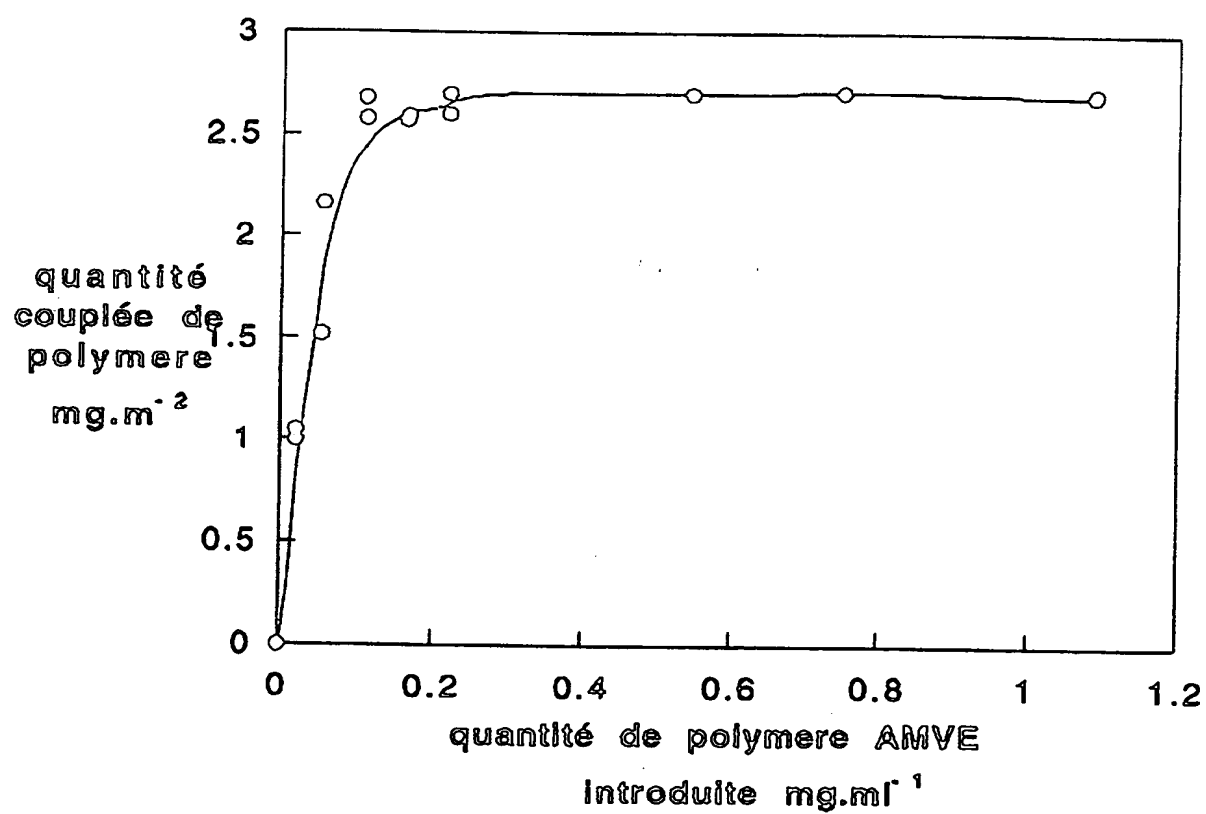
23. Phase de capture d'un matériel biologique cible, caractérisée en ce qu'elle est sous forme microparticulaire ou linéaire et est constituée par au moins un premier polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des premiers groupements complexants, ces derniers étant liés par coordination à un premier métal de transition, qui est lui-même lié à une première entité biologique susceptible de reconnaître le matériel biologique cible.

24. Phase de détection d'un matériel biologique cible, caractérisée en ce qu'elle est sous forme

microparticulaire ou linéaire et est constituée par au moins un second polymère particulaire ou linéaire, avec un caractère apparent hydrophile et des seconds groupements complexants, ces derniers étant liés par coordination à un
5 second métal de transition, qui est lui-même lié à une seconde entité biologique susceptible de reconnaître le matériel biologique cible, et un marqueur.

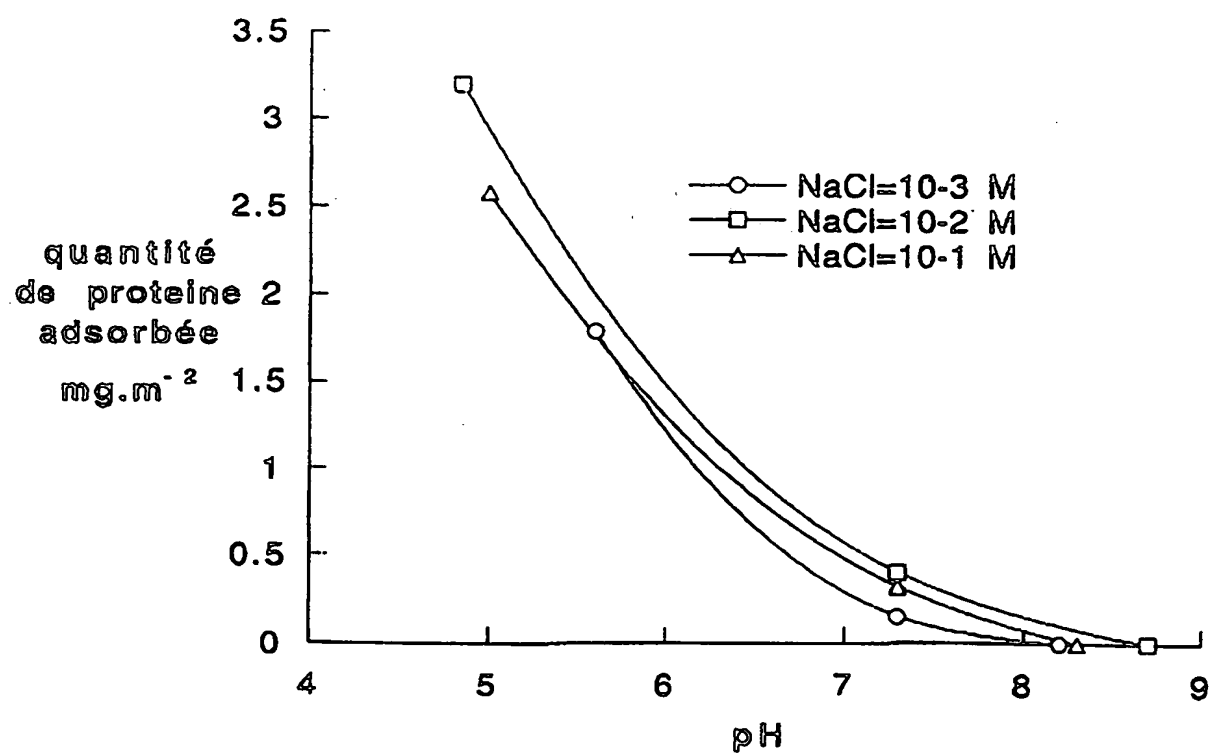
25. Réactif de mise en évidence d'un matériel biologique cible, comprenant une phase de capture selon la
10 revendication 23 et/ou une phase de détection selon la revendication 24.

FIG 1



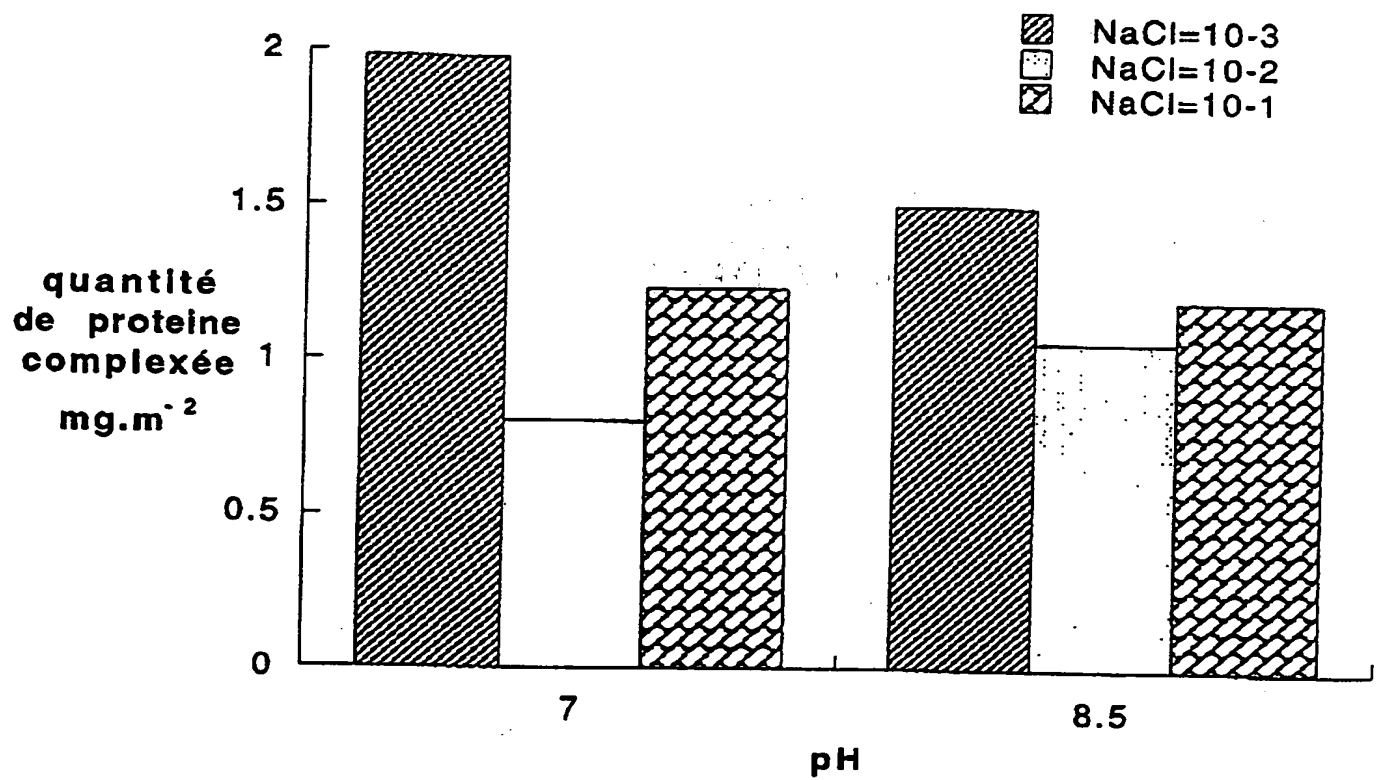
BLANK PAGE

FIG 2



BLANK PAGE

FIG 3



BLANK PAGE